



Tarım Alanlarından İzole Edilen *Bacillus* spp., Suşlarının Ürettiği İnsektisidal Proteinlerinin Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu

Uğur AZİZOĞLU^{1*}

¹ Kayseri Üniversitesi, Safiye Çıkrıkçıoğlu Meslek Yüksek Okulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Kayseri

*Sorumlu Yazar (Corresponding author): azizoglu@kayseri.edu.tr

Özet

Bu çalışmada, tarım arazilerinden izole edilen *Bacillus* spp. suşlarının ürettiği insektisidal proteinler, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) kullanılarak karakterize edilmiştir. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bakterisinin ürettiği Cry proteinleri, böcekler üzerinde toksik etkiler gösteren kristal yapılardır ve biyolojik mücadele alanında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Araştırmada, Kayseri ilinin 5 farklı ilçesinin tarım alanlarından toplanan toprak örneklerinden *Bacillus* suşları izole edilmiştir. Çalışma kapsamında toplam 203 bakteri izolatu elde edilmiş ve bunların 75 'nin *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Bu suşlar arasında, 5 *Bacillus thuringiensis* suşunun insektisidal kristal protein (ICP) ürettiği gözlemlenmiştir. FESEM analizleri sonucunda, bipyramidal, küresel ve düzensiz şekillerde ICP yapıları elde edilmiştir. Bu proteinlerin böcek türleri üzerinde etkili olabileceği ve tarım zararlılarıyla mücadelede biyopestisit olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Characterization of Insecticidal Proteins Produced by *Bacillus* spp. Strains Isolated from Agricultural Fields by Field Emission Scanning Electron Microscopy

Abstract

In this study, insecticidal proteins produced by *Bacillus* spp. strains isolated from agricultural fields were characterized using field emission scanning electron microscopy (FESEM). Cry proteins produced by the bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) are crystalline structures with toxic effects on insects and are widely used in biological pest control. The research involved isolating *Bacillus* strains from soil samples collected from agricultural areas across five different districts in Kayseri Province. A total of 203 bacterial isolates were obtained, of which 75 were identified as belonging to the *Bacillus* genus. Among these, five *Bacillus thuringiensis* strains were observed to produce insecticidal crystal proteins (ICPs). FESEM analyses revealed ICP structures in bipyramidal, spherical, and irregular shapes. These proteins were found to be effective against insect species, suggesting their potential as biopesticides in agricultural pest management.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi :26.08.2024

Kabul Tarihi :28.09.2024

Anahtar Kelimeler

Bacillus

cry protein

elektron mikroskop

suşlar

Research Article

Article History

Received :26.08.2024

Accepted :28.09.2024

Keywords

Bacillus

cry protein

electron microscopy

strains

1. Giriş

Biyoinsektisitler, entomopatojen bakteriler, mantarlar, nematodlar ve virüsleri içeren biyolojik ajanlar aracılığıyla tarımsal zararlıları hedef alan çevre dostu pestisitlerdir. Son yıllarda, biyoinsektisitlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar artmıştır; bu artış, sentetik kimyasalların çevresel zararlarının anlaşılmasıyla daha da hızlanmıştır. Biyoinsektisitler, yalnızca zararlı kontrolünde değil, aynı zamanda ekosistem sağlığını koruma ve insan sağlığı risklerini en aza indirme bakımından da güvenli bir alternatif olarak görülmektedir. Tarımda biyoinsektisitlerin kullanımı yaygınlaşmış olup, ekolojik dengenin korunmasında önemli rol oynamaktadır.

Bacillus thuringiensis (*Bt*), biyoinsektisitlerin yaygın bir örneği olup, larval aşamada böceklerde öldürücü etki gösteren kristal proteinler (Cry proteinleri) üretir. Bu proteinler, böceklerin sindirim sisteminde bağlanarak hücrelerde lizise yol açar ve böylece zararlıyı öldürür. Piretrin, neem yağı ve spinosad gibi doğal bileşikler ise belirli böcek türlerine karşı etkili olup kimyasal pestisitlere göre daha düşük toksisite seviyesine sahiptir ve hedef dışı organizmalara daha az zarar verir (Azizoğlu ve ark., 2012).

Bacillus türü bakteriler, başlıca toprak olmak üzere pek çok farklı kaynaktan izole edilebilmektedir (Raymond ve ark., 2010). Bu türler arasında bulunan *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), yaşam döngüsünü iki ana evrede tamamlar: vejetatif hücre bölünmesi ve sporlanma. Gram pozitif hücre duvarına sahip olan ve çubuk formunda, 2-5 µm uzunluğunda ve 1 µm genişliğinde olan vejetatif hücreler, bu bakterinin ilk evresini temsil eder (Bulla ve ark., 1980). Sporlanma sırasında, *Bt*, Cry proteinleri olarak bilinen kristal proteinler üretir ve bu proteinler, spesifik pestisit etkileri nedeniyle dünya genelinde biyolojik mücadelede yaygın bir şekilde kullanılır

(Schnepf ve ark., 1998). Cry proteinleri, tarımsal zararlı böcek takımlarının belirli türlerine karşı toksik etkiler gösterir. Sporlanma süreci, yedi aşamalı asimetrik bir hücre bölünmesini içerir. İlk olarak aksiyal filamentler oluşur, ardından ön spor septumu meydana gelir ve üçüncü aşamada parasporal kristallerin oluştuğu engulfment süreci başlar. Dördüncüden altıncı aşamaya kadar ekzosporium, öncül hücre duvarı ve korteks gelişimi gerçekleşir; yedinci ve son aşama ise sporun olgunlaşması ile tamamlanır (Mohamed ve ark., 2010). *Bt*'nin, nematodlar ve akarlar gibi bazı omurgasızlara da toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Van Frankenhuyzen, 2009). *Bt*'nin tanımlanması sırasında kristal proteinlerin ve bunlara ait genlerin tespiti büyük önem taşır. Bu amaçla, *Bt*'nin ürettiği kristal proteinlerin boyanması ve ışık veya faz-kontrast mikroskopları ile incelenmesi etkili yöntemlerdir. Kristal yapıların daha ayrıntılı incelenmesi içinse elektron mikroskobu kullanımı tercih edilir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Toprak örneklerinin toplanması

Kayseri ilinin yoğun tarım yapılan Felahiye, Yeşilhisar, Yahyalı, Akkışla ve Sarıoğlan ilçelerinden toprak örnekleri toplanmıştır. Toprak örneklerinin alınacağı yerlerin ticari mikrobiyal gübre ve mikrobiyal insektisit (*Bt* temelli) uygulaması yapılmamış alanlar olmasına dikkat edilerek, özellikle tarım alanlarından alınan numuneler için çiftçilerden ticari gübre ve mikrobiyal insektisit uygulayıp uygulamadıkları teyit edilmiştir. Örnekler toplanırken; 3-7 cm derinlikten tüm tarlayı temsil edecek şekilde 10 farklı noktadan yaklaşık 100'ar gram alınarak karıştırılmış ve numaralandırılmıştır. Örnek alınan yerlerin koordinat bilgileri GPS ile kayıt edilerek (Tablo 1) toprak örneklerinin alındığı lokasyonlar enlem, boylam ve yükseklikleri dikkatli şekilde kayıt altına alınmıştır. Bakteri izolasyonu yapılabildiği kadar toprak örnekleri +4 °C'de saklanmıştır.

Tablo 1. Toprak örneklerinin alındığı lokasyonlar ve GPS kayıtları**Table 1.** GPS records and locations of soil samples collection

Lokasyon	Enlem	Boylam	Rakım (m)
Felahiye-arpa tarlası	N 39 6' 6,4"	E 35 34' 57"	1331
Yeşilhisar-ayçiçeği tarlası	N 38 19' 44"	E 35 05' 46"	1101
Yahyalı-pancar tarlası	N 38 10' 00"	E 35 21' 25"	1103
Akkışla- İtalyan çimi, yemlik	N 39 2' 57"	E 36 1' 47"	1191
Sarıoğlan-buğday tarlası	N 39 1' 8"	E 35 56' 4"	1184

2.2. Toprak örneklerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Toprak örneklerinin analizleri Erciyes Üniversitesi Toprak ve Bitki Besleme Laboratuvarında yapılmıştır. pH, organik madde, azot, fosfor, potasyum, değişebilir katyonları (Na, Ca, Mg ve K) ve mikro element (Fe, Cu, Zn ve Mn) analizleri ile toprakların fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir.

2.2.1. Toprak tekstürü

Toprakların tekstür analizinde "Bouyoucus hidrometre yöntemi" kullanılmıştır (Gee ve Hortage, 1986).

2.2.2. Toprak reaksiyonu (pH)

Toprağın pH değeri, 1:2,5 oranında toprak-su karışımı ile hazırlanmış çözeltilerde cam elektrotlu pH metre yardımıyla potansiyometrik olarak ölçülmüştür (McLean, 1982).

2.2.3. Elektriksel iletkenlik (EC)

Yetiştirme ortamının EC değerleri elektriksel iletkenlik aleti ile belirlenecektir (Demiralay, 1993).

2.2.4. Kireç tayini (%)

Topraktaki kireç oranı, Nelson (1982) tarafından belirtilen yöntemle Scheibler Kalsimetresi kullanılarak volümetrik olarak hesaplanmıştır (Nelson, 1982).

2.2.5. Organik madde miktarı (%)

Toprağın organik madde içeriği, Walkley-Black yöntemine göre belirlenmiştir (Walkley ve Black, 1934).

2.2.6. Değişebilir katyon tayini

Topraktaki değişebilir katyon miktarları (Na, Ca, Mg ve K), 1 N amonyum asetat (pH=7.0) ile ekstrakte edildikten sonra ICP-

OES cihazında okunarak belirlenmiştir (Rhoades, 1982).

2.2.7. Fosfor tayini

Topraktaki fosfor içeriği, molibdofosforik mavi renk yöntemiyle oluşturulan çözeltilerin 660 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede ölçülmesiyle saptanmıştır (Olsen ve Summers, 1982).

2.2.8. Toplam azot tayini (%)

Toprağın azot miktarı, salisilik asit, sülfürik asit ve tuz karışımıyla yaş yakma işlemi uygulanarak mikrokjeldahl yöntemi ile hesaplanmıştır (Bremner, 1996).

2.2.9. Mikro element tayini

Elverişli Fe, Cu, Zn ve Mn miktarları, DTPA yöntemi ile elde edilen süzüntülerde ICP-OES kullanılarak ölçülmüştür (Lindsay ve Norvell, 1978). Toprak içeriklerinin karşılaştırılması için MSTAT programı ile tek faktörlü ANOVA varyans analizi yapılmıştır. %99 güven aralığında ortalamalar, Tukey-Kramer HSD post-testiyle değerlendirilmiştir.

2.3. Toprak örneklerinden *Bacillus* cinsine ait bakterilerin izolasyonu

Toprak örneklerinden *Bacillus* cinsine ait bakterileri izole etmek amacıyla her bir toprak örneğinden 1 gram alınarak 9 ml steril saf su ile karıştırılmıştır. Örnekler, vorteks yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakika bekletilmiştir. Süre bitiminde karışımların üst kısmındaki sıvıdan 1 ml alınarak, içinde 0.25 M Sodyum-Asetat ile tamponlanmış 5 ml Luria-Bertani Broth (LB Broth) besiyeri bulunan 50 ml'lik falcon tüplerine aktarılmış ve 30 °C'de, 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örneklerden 1 ml alınarak, steril ependorf tüplerde 5 dakika boyunca 80°C sıcaklığa maruz bırakılmıştır.

Bu sürenin ardından örnekler, LB agar içeren petri kaplarına ekilerek 30 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün oluşan kolonilerden farklı özellikte olanlar seçilerek T3 katı sporlanma besiyerine ekilmiş ve yeniden 30°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Travers ve ark., 1987; Azizoğlu, 2009; Katı ve ark., 2016).

2.4. Bakteriye izolatların taramalı elektron mikroskop görüntüsü

Basil olduğu belirlenen izolatlar, 5 ml T3 sıvı sporlandırma besiyerinde (T3 Sıvı sporlanma besiyeri; 1 lt distile su içerisinde 3 gr tripton, 2 gr triptoz, 1.5 gr maya özütü, 0.005 gr mangan klorür (MnCl₂), 6 gr monobazik sodyum fosfat (NaH₂PO₄), 7.1 gr dibazik sodyum fosfat (Na₂HPO₄) olacak şekilde çözelti hazırlanmış ve pH 6.8±2 ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dk. otoklav edilmiştir (Travers ve ark., 1987). 30 °C'de 200 rpm'de, 7 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde yetiştirilmiştir. 7. gün sonunda bakteri

kültürleri 4 °C 20.0000 xg'de çöktürülerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 1 ml steril dH₂O çözdürülerek solüsyondan 10 µl alınmış ve lam üzerine dikkatlice yayılmıştır. Lamlar oda sıcaklığında kurtulduktan sonra çift taraflı bant yardımıyla numune tutuculara sabitlenen örnekler, polaron sc 7620 mini sputter coater yardımıyla yaklaşık 45 angstrom kalınlığında Au/Pd (%80-%20Pd) ile kaplandıktan sonra Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde bulunan Zeiss Gemini 500 FESEM cihazında 16.00, 20.00, 30.00, 40.00 ve 50.00 K X farklı büyütmelemlerde görüntülenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Toprak örneklerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Toplanan tüm toprak örneklerinin killi-tınlı özellikte olduğu tespit edilmekle birlikte, pH ve mikro besin elementleri açısından belirgin farklılıklar sergilediği görülmüştür (Tablo 2).

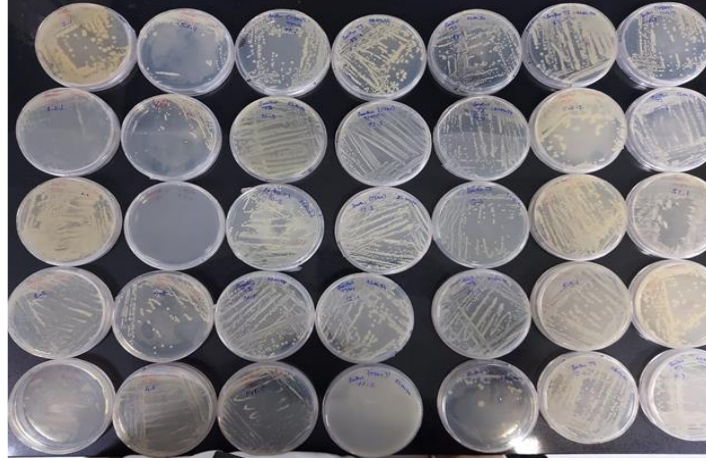
Tablo 2. Toprak örneklerinin analizi sonuçları
Table 2. Results of soil samples analyses

Toprak Örnekleri	Tekstür	pH	EC µs/cm	Organik madde %	Toplam N %	Kireç %	Fosfor kg da 1	Ca mg kg ⁻¹	K mg kg ⁻¹	Mg mg kg ⁻¹	Na mg kg ⁻¹	Cu mg kg ⁻¹	Fe mg kg ⁻¹	Mn mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹
Felahiye-arpa tarlası	Killi tın	8.00	258.0	2.43	0.12	13.35	4.86	1649.4	89.0	31.0	35.2	0.67	0.44	0.91	0.80
Yeşilhisar-ayçiçeği tarlası	Killi tın	8.97	464.0	2.88	0.14	13.52	3.26	1756.6	87.5	31.5	102.5	0.44	0.78	0.78	0.88
Yahyalı-pancar tarlası	Killi tın	7.81	496.0	2.96	0.15	14.53	3.65	1865.2	76.0	27.5	61.2	0.38	1.25	0.67	1.15
Akkışla- İtalyan çimi	Killi tın	7.99	507.0	2.96	0.15	8.54	2.36	1502.6	74.0	24.0	63.5	0.40	0.88	0.84	0.74
Sarıoğlan- buğday tarlası	Killi tın	8.43	366.0	2.86	0.14	12.58	7.45	2023.6	84.0	28.5	27.5	0.34	0.68	0.56	0.81

3.2. *Bacillus* cinsine ait bakterilerin belirlenmesi ve tanımlanması

5 ilçenin tarım arazisinden (Felahiye-arpa tarlası, Yeşilhisar-ayçiçeği tarlası, Yahyalı-pancar tarlası, Akkışla-İtalyan çimi, yemlik,

Sarıoğlan-buğday tarlası) alınan toprak örneklerinden toplamda 203 bakteri izolasyonu yapılmış ve 75 adet *Bacillus* cinsine ait bakteri suşu izole edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Bacillus* spp., izolatlarının LB katı besi ortamında koloni şekilleri

Figure 1. Colony morphology of *Bacillus* spp. isolates on LB agar medium

3.3. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile insektisidal proteinlerin karakterizasyonu

Bacillus thuringiensis'in karakteristik özelliği olan Bipyramidal, Cubic, Spherical ve Irregular şekilli ICP (İnsektisidal kristal protein) proteinler görüntülenmiştir (Azizoğlu,

2011; Azizoglu ve ark., 2015; Yilmaz ve ark., 2017). 75 *Bacillus* spp., suşundan sadece 5 *Bacillus thuringiensis* suşunun insektisidal kristal protein ürettiği belirlenmiştir. 150 elektron mikroskop görüntüsü içinde farklı şekillerde olan 5 suşun net şekilde insektisidal protein ürettiği belirlenmiştir.

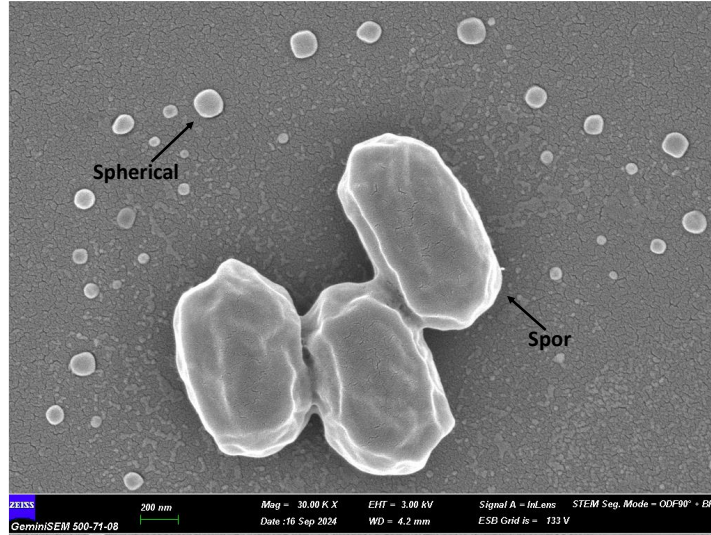


Şekil 2. *Bacillus thuringiensis* UA 60-2 suşunun bipyramidal protein görüntüsü

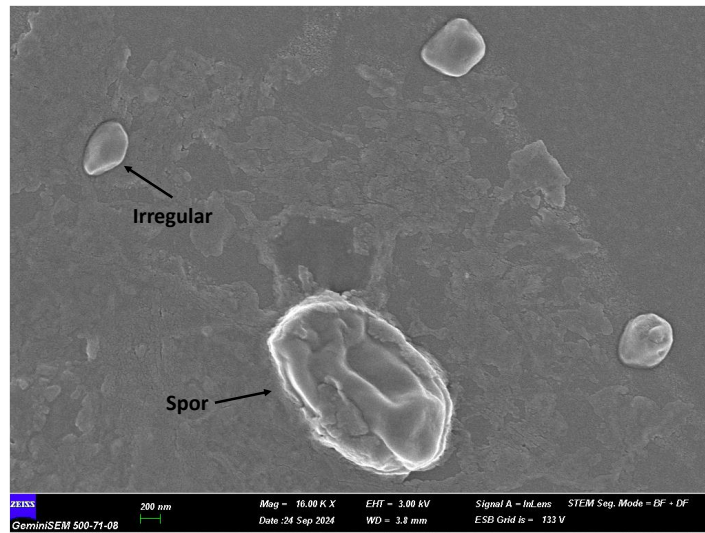
Figure 2. Bipyramidal protein structure of *Bacillus thuringiensis* UA 60-2 strain



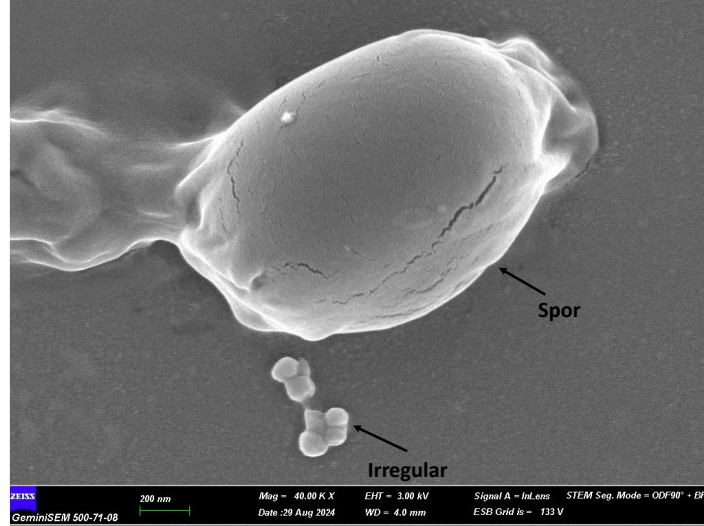
Şekil 3. *Bacillus thuringiensis* UA 66-6 suşunun bipyramidal protein görüntüsü
Figure 3. Bipyramidal protein structure of *Bacillus thuringiensis* UA 66-6 strain



Şekil 4. *Bacillus thuringiensis* UA 69-3 suşunun spherical protein görüntüsü
Figure 4. Spherical protein structure of *Bacillus thuringiensis* UA 69-3 strain



Şekil 5. *Bacillus thuringiensis* UA 77-1 suşunun irregular protein görüntüsü
Figure 5. Irregular protein structure of *Bacillus thuringiensis* UA 77-1 strain



Şekil 6. *Bacillus thuringiensis* UA 82-3 suşunun irregular protein görüntüsü

Figure 6. Irregular protein structure of *Bacillus thuringiensis* UA 82-3 strain

4. Sonuç

Bt'nin ürettiği ICP'ler, kristal yapılarının morfolojisine göre çeşitli gruplara ayrılır. Bunlar arasında en bilinenleri.

4.1. Bipiramidal kristaller

Bu kristaller, genellikle Lepidoptera (kelebekler ve güveler) türlerine karşı etkilidir. Cry1 proteinleri, en çok kullanılan *Bt* toksinleri arasında yer alır ve özellikle mısır, pamuk gibi tarım ürünlerinde Lepidoptera zararlılarıyla mücadelede kullanılır (Li ve ark., 2022).

4.2. Küresel kristaller

Diptera (sivrisinek ve kara sinek) türlerine karşı toksik olan Cry4 proteinleri, özellikle hastalık taşıyan sinek popülasyonlarını kontrol etmede kullanılır (Li ve ark., 2022).

4.3. Düzensiz kristaller

Bu tip kristaller ise daha geniş bir böcek grubuna etki gösterir ve diğer Cry proteinleri ile sinerjik olarak çalışarak toksisitesini artırabilir. Bu özellikleri sayesinde böcek türlerinde direnç gelişimini engellemede etkili olabilir (Wang ve ark., 2014). *Bt* insektisidal kristal proteinleri, biyolojik mücadelede sürdürülebilir bir seçenek sunar; ancak çevresel etkiler ve direnç sorunları nedeniyle dikkatli bir kullanım gerektirir. *Bt* proteinlerinin toprakta uzun süre kalıcılığı ve diğer organizmalar üzerindeki etkileri nedeniyle *Bt* transgenik bitkilerin ekim alanları, direnç yönetim programları ve

çevresel güvenlik değerlendirmeleri titizlikle yapılmalıdır (Wang ve ark., 2014). *Bt* proteini içeren biyopestisitlerin verimli ve güvenli kullanımını sağlamak için tarımsal uygulamalarda daha çeşitli *Bt* toksinleri ve kombinasyonları kullanılmalıdır.

Bt tarafından üretilen Cry proteinleri, tarımsal zararlılarla biyolojik mücadelede böceklere özgü şekilleri ve etki mekanizmaları ile öne çıkar. Bu proteinlerin her biri, farklı böcek türlerine uyum sağlayacak şekilde yapılandırılmıştır. Cry1 proteinleri, bipiramidal yapıları sayesinde Lepidoptera takımındaki zararlılarda (örneğin kelebek ve güve larvalarında) bağırsak hücrelerine bağlanarak hücrede por (gözenek) oluşumuna neden olur. Cry2 proteinleri ise çift etkili bir yapı sunarak hem Diptera (karasinek ve sivrisinek gibi) hem de Lepidoptera türlerinde toksisite gösterir. Cry3 proteinleri ise kübik yapılarıyla Coleoptera (örneğin, patates böceği) üzerinde yüksek etkinlik sağlar.

Son yıllarda, Cry proteinlerinin böceklere özgü yapısal özellikleri üzerinde genetik modifikasyonlarla yapılan araştırmalar, proteinlerin spesifik zararlılara karşı etkinliklerini artırmayı hedeflemektedir. Örneğin, Cry2Ab proteinin mutasyonları ile farklı türlerdeki böcek bağırsak hücrelerine uyum sağlayan versiyonları geliştirilmiştir. Bu şekilde optimize edilen Cry proteinleri, biyopestisit etkinliğini artırarak çevreye daha

az zarar veren ve hedef odaklı zararlı kontrolü sağlama potansiyeline sahiptir (Fu ve ark., 2024).

Finansman

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 123O376 kodlu proje kapsamında desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Açıklama

Yazar, toprak analizi konusundaki değerli yardımlarından dolayı Dr. Adem Güneş'e ve istatistiksel veri analizi için Dr. Salih Karabörklü'ye teşekkür eder.

Kaynaklar

Azizoglu, U., Yilmaz, S., Ayvaz, A., Karabörklü, S., 2015. Effects of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 spore-crystal mixture on the adults of egg parasitoid *Trichogramma evanescens* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29:653-658.

Azizoglu, U., Yilmaz, S., Ayvaz, A., Karabörklü, S., Akbulut, M. 2011. Characterization of local *Bacillus thuringiensis* isolates and their toxicity to *Ephestia kuehniella* (Zeller) and *Plodia interpunctella* (Hübner) larvae *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 21:143-150.

Azizoğlu, U. 2009. Ultraviyole radyasyonu ile ışınlanmış *Ephestia kuehniella* ve *Plodia interpunctella* larvaları üzerine tarım arazilerinden izole edilen *Bacillus thuringiensis* izolatlarının etkisi. *Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri*.

Azizoğlu, U., Bulut, S., Yılmaz, S., 2012. Biological control in organic farming; Entomopathogenic bioinsecticides. *Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology*, 28:375-381.

Bremner, J.M., 1996. Nitrogen total. In *Methods of soil analysis part 3: Chemical methods* (D.L. Sparks, (Eds.), SSSA Book Series 5, *Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin*, 1085-1122.

Bulla, L.A., Bechtel, D.B., Kramer, K.J., Shethna, Y.I., Aronson, A.I., Fitz-James, P.C., 1980. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Critical Reviews in Microbiology*, 8:147-204.

Demiralay, İ., 1993. Toprak Fiziksel Analizleri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları* No:143, Erzurum.

Fu, B.W., Xu, L., Zheng, M.X., Shi, Y., Zhu, Y. J., 2024. Engineering of *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab toxin for improved insecticidal activity. *AMB Express*, 14(1):1-8.

Gee, G.W., Hortage, K.H., 1986. Particle-size analysis. *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods second edition. Agronomy* No:9, 2. Edition pp., 383-441.

Katı, H., Karaca, B., Gülşen Ş. H. 2016. Toprakta izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2:281-290.

Li, Y., Wang, C., Ge, L., Hu, C., Wu, G., Sun, Y., Song, L., Wu, X., Pan, A., Xu, Q., Shi, J., Liang, J., Li, P., 2022. Environmental behaviors of *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal proteins and their effects on microbial ecology. *Plants (Basel)*, 11(9): 1-18.

Lindsay, W.L., Norvell, W.A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42:421-428.

McClean, E.O., 1982. Soil pH and lime requirement. *Methods of soil analysis part 2. Chemical and microbiological properties second edition. Agronomy. No:9, Part2 Edition pp.,199-224*.

- Mohamed, A.I., Griko, N., Junker, M., Bulla, L.A., 2010. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1:31-50.
- Nelson, R.E., 1982. Carbonate and gypsum. methods of soil analysis part2. Chemical and microbiological properties second edition. *Agronomy*. No:9, Part2 Edition pp., 191-197.
- Olsen, S.R., Sommers, L.E., 1982. Phosphorus. methods of soil analysis part2. Chemical and microbiological properties second edition. *Agronomy*. No:9, Part2 Edition pp., 403-427.
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., Crickmore, N., 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen. *Trends in Microbiology*, 18(5):189-194.
- Rhoades, J.D., 1982. Exchangeable cations. Methods of soil analysis part2. Chemical and microbiological properties second edition. *Agronomy*. No:9. Part 2 Edition pp., 159-164.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:775-806.
- Travers, R. S., Martin, P. A. W., Reichelderfer, C.F., 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:1263-1266.
- Van Frankenhuyzen, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101:1-16.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37:29-38.
- Wang, F., Peng, S., Cui, K., Nie, L., Huang, J., 2014. Field performance of “*Bt*” transgenic crops: A review. *Australian Journal of Crop Science*, 8(1):18-26.
- Yılmaz, S., Ayvaz, A., Azizoglu, U., 2017. Diversity and distribution of *cry* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wild ecological areas of East-Mediterranean region of Turkey. *Tropical Ecology*, 58:605-610.

Atf Şekli	Azizoğlu, U., 2025. Tarım Alanlarından İzole Edilen <i>Bacillus</i> spp., Suşlarının Ürettiği İnsektisidal Proteinlerinin Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskopu ile Karakterizasyonu. <i>ISPEC Tarım Bilimleri Dergisi</i> , 9(1): 65-73. DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.14168751 .
To Cite	Azizoğlu, U., 2025. Characterization of Insecticidal Proteins Produced by <i>Bacillus</i> spp. Strains Isolated from Agricultural Fields by Field Emission Scanning Electron Microscopy. <i>ISPEC Journal of Agricultural Sciences</i> , 9(1): 65-73. DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.14168751 .